Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Einfluß eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes auf die transplantationsbedingte Milzfollikelaktivierung bei Mäusen

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ARMIN SCHNEIDER
aus Ravensburg

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536518_0007

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Einfluß eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes auf die transplantationsbedingte Milzfollikelaktivierung bei Mäusen

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ARMIN SCHNEIDER
aus Ravensburg

1984

Dekan:	Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter:	Frau Priv.Doz. Dr. E. Heidemann
2. Berichterstatter:	Frau Prof. Dr. H. Fischbach

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1.	Extraktion des Inhibitors	5
2.2.	Extraktmengen	5
2.3.	Versuchstiere	6
2.4.	Hauttransplantation	7
2.5.	Injektion des teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes Ü30	7
2.6.	Aufarbeitung der Tiere	9
2.7.	Weiterverarbeitung der Milzen	10
2.8.	Auswertung der am Mikrotom geschnittenen paraffineingebetteten Milzanteile (Morphometrie)	10
2.9.	Statistische Auswertung der Meßergebnisse	11
2.10.	Durchführung des Agar-Immundiffusionstestes nach Ouchterlony	11
3.	ERGEBNISSE	13
3.1.	Makroskopische Ergebnisse der Erst- und Nachoperation	13
3.2.	Mikroskopische Ergebnisse (Morphometrie der Milzschnitte)	13
3.3.	Ergebnisse des Immundiffusionstestes	21
4.	DIKUSSION	22
5.	ZUSAMMENFASSUNG	31
6.	LITERATURVERZEICHNIS	32

ABKÜRZUNGEN

AKR/Bom-Mäusestamm:	neigt in 80% bis 90% zur spontanen Ausbildung einer akuten T-lymphoblastischen Leukämie
ADCC:	Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
Histokompatibilitäts	(HLA) antigene: Antigene an der Oberflächenmembran der Zellen, die allen Zellen eines Individuums antigene Identität geben
PHA:	Phytohämagglutinin = pflanzliches Lektin, das T-Lymphozyten stimuliert
RNA:	Ribonukleinsäure
Ü 30:	teilweise membrangereinigter Kalbsmilzextrakt (Überstand der Amicon PM 30-Membran)

1. EINLEITUNG

Die Entwicklung von Inhibitoren zur Unterdrückung unkontrollierter immunreaktiv bedingter oder neoplastischer Zellproliferation ist von Bedeutung für Immunologie und Onkologie.

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist eine Beeinflussung der Zellproliferation mittels unspezifischer, zytotoxisch wirksamer Agenzien unter Inkaufnahme einer Reihe von gravierenden Nebenwirkungen möglich. Probleme ergeben sich hieraus zum einen in der Behandlung maligner Neoplasien, zum anderen in der unerläßlichen Unterdrükkung von Reaktionen, die durch Aktivierung des Immunsystems nach Transplantationen (z.B. Haut-, Nieren-, Knochenmarktransplantationen) zustande kommen.

Bereits 1957 erstellten WEISS et.al. (64) ein Modell über Wachstum und Wachstumskontrolle von Geweben und postulierten neben der Existenz von stimulierenden Faktoren auch die von gewebespezifisch antimitotisch wirkenden Substanzen. WEISS sowie nachfolgende Autoren stellten sich als mögliches Aktionsprinzip vor, daß von ausdifferenzierten Zellen eines Gewebes ein Inhibitor gebildet wird, der im Sinne einer negativen Rückkopplung konzentrationsabhängig die Teilung der undifferenzierten Stammzellen hemmt. Bei endgültiger Größe eines Organs stellt sich nach ihrem Konzept im

Gegenspiel mit den das Wachstum stimulierenden Faktoren ein Fließgleichgewicht (steady state) bezüglich Zellbildung und Zellverbrauch ein, die Gewebshomöostase wird aufrechterhalten (64, 61, 2, 63, 56).
Einen solchen Inhibitor fanden BULLOUGH et.al. (7) in Extrakten aus Mäuseepidermis. Eine Bezeichnung von A. E.SCHAFER wieder aufgreifend, nannten sie ihren gewebespezifischen, nicht toxischen, artunspezifischen, reversibel wirkenden Inhibitor "Chalon" (6-8).
In der Folgezeit wurden ähnliche Faktoren aus verschiedenen Geweben extrahiert und teilweise charakterisiert. (29, 30, 33, 63).
MOORHEAD et.al.(50) konnten zeigen, daß wässrige Extrakte aus Schweinelymphknoten in vitro spezifisch die DNA-Synthese und die Mitoserate PHA-stimulierter menschlicher Lymphozyten reduzieren.
LASALVIA et.al.(41) beschrieben eine Hemmung des H_3 - Thymidineinbaus in transformierte menschliche Lymphozyten durch wässrige Kalbsmilzextrakte. RNA- und Proteinsynthese blieben unbeeinflußt. KIGER et.el. (36) sowie GARCIA-GIRALT et.al.(18, 19) berichten über einen teilweise gereinigten Kalbsthymusextrakt, der die Überlebenszeit von Hauttransplantaten auf Mäusen im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant verlängerte und eine bei Mäusen experimentell ausgelöste Graft-versus-host reaction verminderte.

Durch wässrige Extraktion verschiedener Gewebe unterschiedlicher Spezies zeigten HOUCK et.al. (29,30,32) die gewebespezifische Wirkung bei gleichzeitiger Artunspezifität solcher als Lymphozytenchalon bezeichneter Inhibitoren. Biochemisch wird dieses Chalon als saures Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 30 000 und 50 000 charakterisiert.
HEIDEMANN et.al. reinigten einen solchen Inhibitor aus Kalbsmilzextrakt, ein saures, nicht an RNA gebundenes Molekül mit gleichem Molekulargewicht (23,24) und zeigten seine Wirkung bei der Behandlung von Mäusen mit AKR-Leukämie. Sie charakterisierten die in der G_1-Phase ansetzende Aktivität weiter mit hitze-, trypsin- und ribonukleaseresistenten Eigenschaften (25).

RYTÖMAA et.al. (58,59) wendeten in einer zeitlich begrenzten klinischen Studie das von ihnen präparierte, teilweise gereinigte Granulozytenchalon mit gewissem Erfolg bei der Behandlung akuter und chronisch myeloischer Leukämie des Menschen an. Der therapeutische Einsatz war zu diesem Zeitpunkt in Anbetracht der mangelnden Reinheit der Substanz und der damit verbundenen Nebenwirkungen verfrüht, dennoch konnte eine Wirkung der verwendeten Granulozytenpräparation bei akuter und chronisch myeloischer Leukämie gesichert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die immunsuppressive Wirkung eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes an Mäusen untersucht werden, deren Immunsystem durch homologe Hauttransplantation aktiviert worden war. Hierzu wurden Hautabstoßung und Milzfollikelaktivierung in verschiedenen Gruppen verglichen, die syngenes, homologes oder gar kein Transplantat erhalten hatten.
Gleichzeitig sollte die Frage der Antigenität des Kalbsmilzextraktes geklärt werden.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Extraktion des Inhibitors

Zur Gewinnung des wachstumshemmenden Extraktes wendeten wir die Methode von HEIDEMANN et.al. (23) an. Kalbsmilzen wurden homogenisiert, das Homogenat mit Azeton gefällt, nachgewaschen und zentrifugiert, anschließend das Sediment in aqua bidest. wieder in Lösung gebracht und diese bei 20 000 G erneut zentrifugiert zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile. Mit Hilfe einer Filtration des gewonnenen Überstandes durch AMICON XM 50- und PM 30-Membranen erhielten wir einen teilweise gereinigten Extrakt als Überstand der PM 30-Membranen, kurz Ü 30 bezeichnet. Anschließend wurde Ü30 gegen destilliertes Wasser dialysiert und dann lyophilisiert.

2.2. Extraktmengen

Um ausreichende Lyophilisatmengen für die Versuche zu erhalten, wurden 40 Kalbsmilzen benötigt, die aus den Schlachthöfen Hechingen, Pfullingen und vorwiegend Tübingen stammten. Gesamtgewicht 19,7 kg, Gewicht der Einzelmilzen zwischen 228 und 840g, im Mittel 494g. Die Extraktmengen der von Anfang bis Ende einzeln präparierten Milzen bewegten sich zwischen 3,7 und 24,4mg.

Bei gemeinsamer Präparation zweier Milzen, die wir vor allem bei kleinen Organen durchführten, lagen die Mengen zwischen 11,1 und 24,0mg. Gesamt-Lyophilisatmengen nach Abschluß der Extraktion: 324,3mg; luftdichte Lagerung bei -20°C bis Versuchsbeginn.

2.3. Versuchstiere

Für die Versuchsanordnung wurden zwei verschiedene Mäusestämme benötigt, von denen mindestens einer ingezüchtet sein mußte. Als Inzuchtmäuse benutzten wir solche vom AKR/Bom-Stamm vom Laboratory Animals Breeding and Research Centre, Gl. Bomholgart Ltd.,8680 Ry in Dänemark.

Bei der zweiten Gruppe handelte es sich um NMRI-Mäuse von der S.Ivanovas GmbH u. Co, 7964 Kisslegg/Allgäu, die nicht rein ingezüchtet waren.Die ausschließlich weiblichen Tiere wogen bei Erhalt ca. 20g, entsprechend einem Alter von ca. 8 Wochen. Je 12 wurden in einen Käfig der Grundmaße 290mm x 230mm gesetzt. Diese sowie Futternäpfe und Trinkgefäße wurden jeden 2. Tag in Formalinlösung eingeweicht und mit Sodalösung gespült. Die Tiere hatten drei Wochen Zeit, sich in ihrer neuen Umgebung zu akklimatisieren.

2.4. Hauttransplantation

An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden jeweils 12 Mäuse operiert, jeweils vier vom AKR- und acht vom NMRI-Stamm. Orthotop wurden nach Entfernung der Rükkenhaare mittels einmaligem Rasieren sowie Desinfektion der Hautstelle die runden, ca. 1cm im Durchmesser großen Hautstücke verpflanzt, und zwar bei den AKR-Mäusen von einem Tier auf das andere sowie von je einer als Transplantatspender dienenden weiteren AKR-Maus auf die NMRI-Mäuse. Näheres siehe auch Dissertation MORE (51).

Nach Abschluß des Operationsprogrammes waren 60 Mäuse operiert worden, die in folgende Gruppen eingeteilt wurden:

Gruppe A (n=20): syngene Transplantation von einer AKR-Maus auf die andere.

Gruppe B (n=20) und C (n=20): homogene Transplantation von AKR-Mäusen auf NMRI-Mäuse.

Zur späteren morphometrischen Auswertung waren Vergleichstiere in zwei weiteren Kontrollgruppen erforderlich:

Gruppe D (n=10): Tiere vom AKR/Bom-Stamm ohne Transplantation mit einer vierwöchigen, an alternierenden Tagen durchgeführ-

ten Injektionsbehandlung mit 0,2ml einer 0,5% Ü30-Lösung in 0,9% NaCl.

Gruppe E (n=10): Tiere vom AKR/Bom-Stamm ohne Transplantation, ohne Injektionsbehandlung.

Alle an einem Tag operierten Mäuse der Gruppen A bis C wurden in einem gemeinsamen Käfig gehalten und nach einem vorher festgelegten Schema mit Pikrinsäure markiert. Veränderungen an den Transplantationsstellen wurden mehrmals täglich beurteilt und protokolliert. Näheres siehe Dissertation MORE (51).

2.5. Injektion des teilweise gereinigten Extraktes Ü30

Das Lyophilisat des aus Kalbmilzen gewonnenen Extraktes wurde aufgetaut, abgewogen und mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer 0,5% Ü30-Lösung gemischt. Diese wurde steril filtriert und in Spritzen aufgezogen. Die Injektionen erfolgten intravenös in einer der vier Schwanzvenen nach folgendem Schema:

Mäuse der Gruppe A (AKR/AKR): Keine Injektionen.

Mäuse der Gruppe B (NMRI/AKR): Injektionen von je 0,2 ml 0,9% NaCl-Lösung jeden 2.Tag.

Mäuse der Gruppe C (NMRI/AKR): Injektionen von 0,2ml 0,5% Ü30-Lösung in 0,9% NaCl.

Beginn der Injektionen am Transplantationstag, sodaß die Tiere an alternierenden Tagen vier Wochen lang je 1mg Ü30 erhielten. Im gleichen Zeitraum wurden die Tiere ohne Transplantation mitbehandelt.

Mäuse der Gruppe D (AKR): Injektion von je 0,2ml 0,5% Ü30-Lösung in 0,9% NaCl

Mäuse der Gruppe E (AKR): keine Injektionen

Insgesamt bestand somit das Versuchsprogramm aus fünf Gruppen, die in der beschriebenen Weise unterteilt wurden.

2.6. Aufarbeitung der Tiere

An insgesamt fünf Nachmittagen zwischen 13^{00} und 17^{00} Uhr wurden die Mäuse der Gruppe A,B,C, an einem weiteren Nachmittag ebenfalls zur gleichen Zeit die übrigen Mäuse der Gruppen D und E aufgearbeitet. Die Mäuse der ersten drei Gruppen wurden zu Beginn in einem Ätherglas narkotisiert, um mittels einer kurzen Pasteurpipette aus dem medialen Augenwinkel ca. 1-2ml Blut gewinnen zu können, welches zur Durchführung des geplanten Agardiffusionstestes nach Ouchterlony in kleine Eppendorf-Gefäße aus Plastik gegeben wurde. Sofort nach der Blutentnahme wurden die Mäuse wieder in das Ätherglas gesetzt, um sie vollends einzuschläfern. Anschließend wurden die Tiere, auch diejenigen der Grup-

pen D und E, einzeln auf eine plastikfolienbespannte Präparationsplatte aus Styropor befestigt. Nach kurzer Sprühdesinfektion des Bauchfells wurde die Haut in Längsrichtung durchtrennt mit einem y-förmigen, auf beide Schlüsselbeine auslaufenden Schnitt. Eröffnung des Peritoneums, Entfernung der Milz,und Eingabe in vorher bereitgestellte numerierte Plastikgefäße der Fa. Greiner mit 4°C warmer, gepufferter Formalinlösung mit pH 7 (bestehend aus Puffertitrisol der Fa. Merck 9887, sowie Formaldehydlösung minimal 37% der Fa. Merck und abgekochtem Aqua dest.).
In dieser Form wurden die Organe luftdicht verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt. Ein Wechsel der Formalinlösung war einmalig nach vier Wochen erforderlich.

2.7. Weiterverarbeitung der Milzen

Die in gepufferter Formalinlösung fixierten Organe wurden in Paraffin eingebettet, um anschließend am Mikrotom Schnitte von 4 - 10 µm Dicke zu gewinnen. Die einzelnen Schnitte erhielten teilweise eine Hämatoxylin-, teilweise eine Giemsa - Färbung.

2.8. Auswertung der am Mikrotom geschnittenen, paraffineingebetteten Milzanteile (Morphometrie)

Die gefärbten Schnitte wurden in einem Zeiss-Polari-

sationsmikroskop betrachtet. Milzfollikel und deren Keimzentren wurden mit folgenden Hilfsmitteln gemessen: ObjektivC. Zeissplan 10,0/0,22; Verstärkung mittels eines Obtuvars 1,6. Eine Quadratzeichnung befand sich in einem Okular Kpl 8x mit Okularmikrometer. Eichung erfolgte mit einem Objektmikrometer, sodaß eine Quadratseite 40µm bzw. ein Quadrat 1600μm^2 betrug. Zur besseren Kenntlichmachung der Follikel wurde ein Schmalbandinterferenzfilter 588nm verwendet. Messung der Follikel- bzw. Keimzentrenfläche erfolgte durch Zählung entsprechender Quadrateinheiten.

2.9. Statistische Auswertung der Meßergebnisse

Die relativen Anteile aktivierter Milzfollikel je Gruppe wurden mit Hilfe einer Logitanalyse für normal verteilte Häufigkeitsdaten verglichen (3), die Follikelflächen der einzelnen Gruppen im Student-Test (13).

2.10. Durchführung des Agar-Immundiffusionstestes nach Ouchterlony

Die mit ca. 1 bis 2ml Blut der Mäuse gefüllten Eppendorf-Gefäße wurden in der Eppendorf-Zentrifuge zwei Minuten lang zentrifugiert, das Serum anschließend dekantiert und in neue Gefäße gegeben. Zuvor wurden 100ml 1% Bacto-Agars (Difco) in Phosphat-gepufferter

physiologischer Kochsalzlösung der Fa. Bio-Merieux mit 0,02% Natriumazid autoklaviert. Jeweils 4ml dieses Agars wurden in verschließbare Petrischalen von ca. 4,5cm Durchmesser gegossen, diese anschließend im Kühlschrank abgekühlt.

I. In einem ersten Versuch wurden mittels einer auf die Petrischalen aufgesetzten Schablone und einem kleinen Stanzzylinder pro Schale insgesamt sechs Löcher präpariert mit einem Durchmesser von 4mm, wobei fünf Löcher eines in der Mitte kreisförmig umgaben, Abstand 8mm. Je 20µl Mäuseserum je einer Maus wurden in die äußeren Löcher gegeben, 20µl 0,5% Ü30 in 0,9% NaCl in das in der Mitte gelegene Loch.

II. In einem zweiten Versuch wurden die Löcher enger gestanzt, Abstand 5mm. In die Mitte wurden wiederum 20µl 0,5% Ü30 gegeben, von den Seren der Mäuse wurde zum Zwecke der Konzentration diesmal 60µl auf einen Objektträger 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur durch Ventilation eingedickt, anschließend wiederum 20µl in die äußeren Löcher pipettiert.

III. Bei einem dritten Versuch wurden die Löcher wie unter II beschrieben eng gestanzt, das in gleicher Weise konzentrierte Serum bereits acht Stunden vor Eingabe von 20µl 0,5% Ü30-Lösung einpipettiert.

Die Auswertung der beschriebenen Versuchsgänge erfolgte jeweils nach 24 Stunden. Auf Konstanz der Temperatur während der Untersuchungszeit wurde geachtet. Bewertet wurden eindeutige Präzipitationslinien, die durch Immunkomplexbildung zustandekommen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Makroskopische Ergebnisse der Erst- und Nachoperation

Die Mäuse wurden insgesamt 28 Tage lang beobachtet. Anhand der beschriebenen Kriterien wurde der Zustand des Transplantates beurteilt.
Die exakten Auswertungen der Ergebnisse sind der Dissertation von MORE (51) zu entnehmen.

3.2. Mikroskopische Ergebnisse (Morphometrie der Milzschnitte)

In der Mäusegruppe A mit syngenen Hauttransplantaten ohne Applikation intravenöser Lösungen wurden insgesamt 385 Follikel ausgemessen, im Durchschnitt 22,7 Follikel pro Maus. Der Anteil aktivierter Follikel beträgt 9,87%. Die durchschnittliche Fläche eines Follikels beläuft sich auf 0,050 mm^2, wobei bei den aktivierten Follikeln die Keimfläche 0,013 mm^2 groß ist.

In der Mäusegruppe B mit homologen Hauttransplantaten und intravenöser Applikation von 0,9%iger Kochsalzlösung wurden insgesamt 479 Follikel ausgemessen, im Durchschnitt 23,9 Follikel pro Maus. Der Anteil der aktivierten Follikel beträgt 86,2%. Die durchschnittliche Fläche eines Follikels beläuft sich auf 0,0868mm^2, wobei bei den aktivierten Follikeln die durchschnittliche Fläche der Keimzentren 0,0233 mm^2 groß ist.

In der Mäusegruppe C mit homologen Hauttransplantaten und intravenöser Applikation von 0,5%iger Ü30-Lösung wurden insgesamt 475 Follikel ausgemessen, im Durchschnitt 23,7 Follikel pro Maus. Der Anteil der aktivierten Follikel beträgt 43,7%. Die durchschnittliche Fläche eines Follikels beläuft sich auf 0,0644 mm^2, wobei bei den aktivierten Follikeln die durchschnittliche Fläche der Keimzentren 0,0238 mm^2 groß ist.

In der Mäusegruppe E, in der weder Transplantationen noch i.v.-Injektionen vorgenommen wurden, wurden insgesamt 85 Follikel ausgemessen, im Durchschnitt 14,2 Follikel pro Maus. Der Anteil der aktivierten Follikel beträgt 3,52%. Die durchschnittliche Fläche eines Follikels beläuft sich auf 0,0506 mm^2, wobei bei den aktivierten Follikeln die durchschnittliche Fläche der Keimzentren 0,01 mm^2 groß ist.

Eine graphische Darstellung der unterschiedlichen pro-

zentualen Follikelaktivierungsraten in den einzelnen Gruppen findet sich in Abb.1, die Zusammenstellung der Zahlenwerte in Tabelle 1.

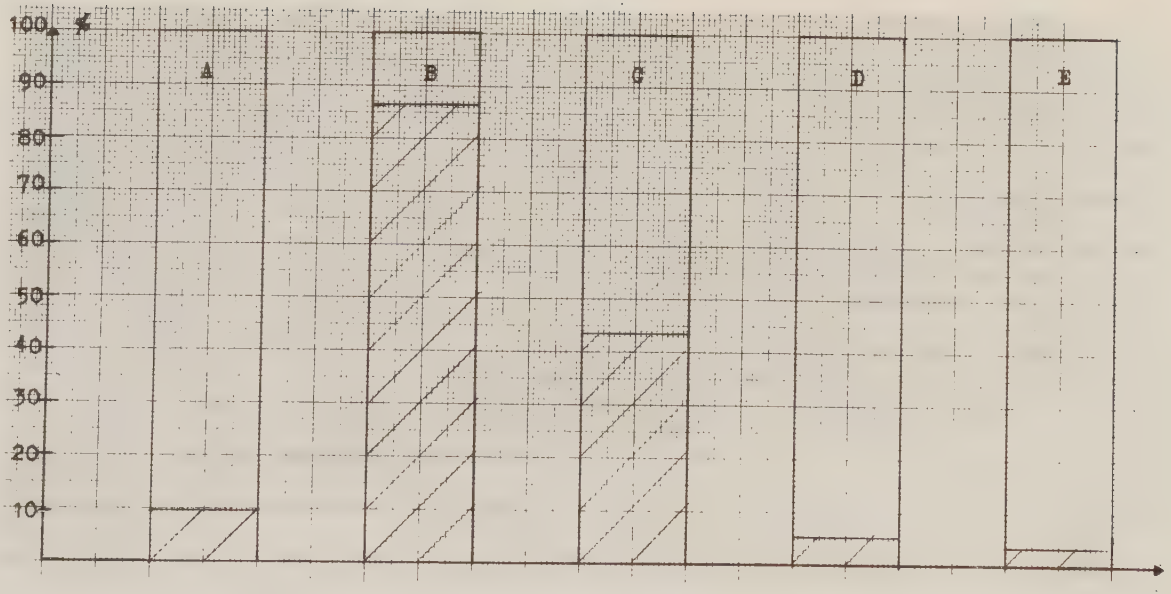


Abb.1 Prozentuale Follikelaktivierungsraten in den Gruppen A bis E

$$\left(\frac{\text{Zahl der insgesamt ausgezählten Follikel je Gruppe}}{\text{Zahl der anteilig aktivierten Follikel je Gruppe}}\right)$$

Die schraffierten Bezirke entsprechen den aktivierten Anteilen

Gruppe A (syngene Transpl.,keine Injekt.beh.); Gruppe B (homologe Transpl., Injekt. von physiolog.NaCl); Gruppe C (homologe Transpl.,Injekt. von Ü30); Gruppe D (keineTranspl.,Injekt. von Ü30); Gruppe E (keine Transpl., keine Injekt.beh.).

Tab. 1 Zusammenstellung der Ergebnisse

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E
Zahl der Mäuse	20	20	20	10	10
Zahl der auswertbaren Präparate	17	20	20	6	6
Gesamtzahl der gemessenen Follikel	385	479	475	135	85
Durchschnittl. Follikelzahl pro Präparat	22,7	23,9	23,7	22,5	14,2
Gesamtzahl der aktivierten Follikel	38	413	208	7	3
Prozentsatz der akt. Follikel	9,87%	86,2%	43,7%	5,25%	3,52%
Durchschnittl. Fläche der Follikel	0,05mm^2	0,086mm^2	0,064mm^2	0,051mm^2	0,050mm^2
Standardabweichung	± 0,032mm^2	± 0,049mm^2	±0,040mm^2	± 0,033mm^2	±0,028mm^2
Durchschnittl. Fläche der Keimzentren	0,013mm^2	0,023mm^2	0,023mm^2	0,017mm^2	0,010mm^2
Standardabweichung	± 0,008mm^2	± 0,015mm^2	±0,017mm^2	± 0,007mm^2	±0,003mm^2

Zusammenfassend zeigt sich, daß eine homologe Transplantation (Gruppe B) zu einer deutlich höheren Follikelaktivierungsrate führt als eine syngene (Gruppe A). Weiterhin wird deutlich, daß die weitaus höhere Follikelaktivierungsrate bei homologer Hauttransplantation (Gruppe B) durch intravenöse Injektionen des teilweise gereinigten Milzextraktes Ü30 signifikant gehemmt wird (Gruppe C). Des weiteren ist erkennbar, daß eine syngene Hauttransplantation (Gruppe A) zu einer signifikant höheren Follikelaktivierungsrate führt als die alleinige Injektion von 0,5%iger Ü30-Lösung. Kein signifikanter Unterschied findet sich dagegen in der Follikelaktivierungsrate der mit teilweise gereinigtem Milzextrakt Ü30 behandelten Mäuse der Gruppe D im Vergleich zu gänzlich unbehandelten Mäusen der Gruppe E gleichen Alters und gleichen Stammes, die unter identischen Umweltbedingungen gehalten werden.

Gemäß der Logitanalyse, wobei im Folgenden p_A, p_B usw. die relativen Anteile der aktivierten Follikel bedeuten, konnten folgende Ergebnisse erhoben werden:

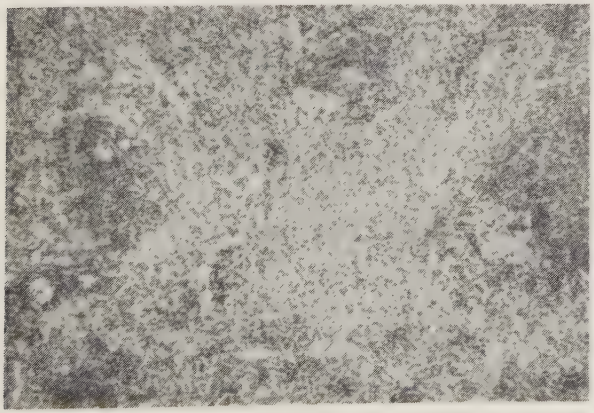
1. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ gilt $p_B > p_A$ und $p_C < p_B$.
2. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gilt $p_A > p_E$.

3. Die Hypothese $p_D = p_E$ kann auf dem Fünf-Prozent-Niveau nicht abgelehnt werden.

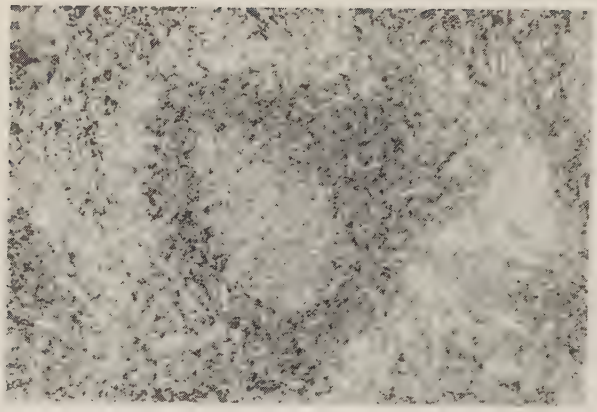
Ein entsprechender Vergleich der Follikelflächen zeigt die im Durchschnitt kleineren Flächen der mit teilweise gereinigtem Milzextrakt Ü30 behandelten Tiere der Gruppe C gegenüber den mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tiere der Gruppe B. Der statistische Vergleich im Student-Test ergibt jedoch nur eine grenzwertige Signifikanz (p=0,07).

Die Größe der durchschnittlichen Fläche der Keimzentren unterscheidet sich hingegen bei den mit teilweise gereinigtem Milzextrakt Ü30 behandelten Tieren nicht von den mit Kochsalz behandelten.

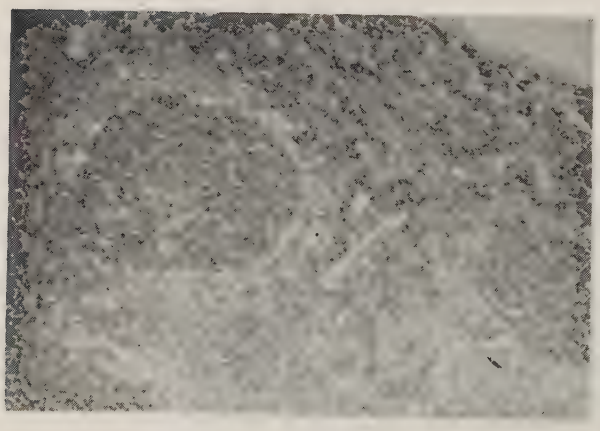
Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Follikelaktivierung in den einzelnen Gruppen ist im Folgenden je ein Milzpräparat beispielhaft abgebildet.



Milzfollikel der Gruppe A
(syngenes Transplant,,keine Injekt.beh.)



Milzfollikel der Gruppe B
(homologes Transplant.,Injekt.v.physiol.NaCl)



Milzfollikel der Gruppe C
(homologes Transplant.,Injekt.v.Ü30)

3.3. Ergebnisse des Immundiffusionstestes nach Ouchterlony

Die Ausbildung eines mit bloßem Auge erkennbaren Präzipitats (Kriterium des positiven Ausfalls des Testes) kam in keinem der gemäß 2.10 I-III durchgeführten Versuche zustande.

4. DISKUSSION

4.1.

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen, daß die Abstoßung der homologen Hauttransplantate einem zeitlich normalen Verlauf entsprach.(51). Sie zeigen ferner die Aktivierung von Milzfollikeln als Ausdruck einer Immunreaktion gegenüber dem Transplantat nach homologer Hauttransplantation. Diese Milzfollikelaktivierung war in der Gruppe C durch intravenöse Gabe des teilweise gereinigten Milzextraktes Ü30 im Vergleich zur Gruppe B (Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung) signifikant vermindert ($p < 0,01$). Es kann daher eine immunsuppressive Wirkung des Milzfaktors mit Hemmung der Lymphozytenproliferation in den Milzfollikeln angenommen werden. Die Hemmung der Zellproliferation in der Mantelzone ohne Beeinflussung der Zellproliferation im Keimzentrum kann vorsichtig als das Ergebnis einer vorwiegenden Hemmung von T-Zellen durch den teilweise gereinigten Milzextrakt Ü30 interpretiert werden.
Eine prozentual höhere Milzfollikelaktivierung in der Gruppe A gegenüber lediglich mit Injektionen bzw. gänzlich unbehandelten Tieren der Gruppe D und E ist allein schon durch den operativen Eingriff erklärbar. Maßnahmen dieser Art sind, insbesondere bei

Tieren, unvermeidbar von einer gewissen Wundkontamination begleitet. Postoperative BSG-Erhöhung mit Leukozytose und unterschiedlichem Fieberverhalten sind auch aus chirurgischen Eingriffen am Menschen bekannt.

In scheinbarem Widerspruch zu diesen Ergebnissen in der Histologie standen zunächst die Ergebnisse bei der Beurteilung der Hauttransplantate. Letztere wurden in der mit dem teilweise gereinigten Milzextrakt Ü30 behandelten Mäusegruppe genauso schnell abgestossen wie in der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Gruppe (51).

Zum besseren Verständnis folgt eine Verdeutlichung der immunologischen Vörgänge.
Bezüglich der Bedeutung zellulärer und humoraler Phänomene bei der Abstoßungsreaktion kann gesagt werden, daß grundsätzlich beide Wege der Immunantwort beteiligt sind, wenn auch die klassische akute Abstoßung, wie im vorliegenden Versuchsmodell gegeben, vorwiegend als ein Ergebnis der zellulären Immunität betrachtet werden muß (15).
Bei direktem, mittels genetisch determinierten Rezeptoren oder indirektem, makrophagenvermittelten Kontakt mit den Histokompatibilitäts- (HLA-) antigenen des Transplantates kommt es zur Sensibilisierung spezifisch antigenreaktiver T-Lymphozyten. Diese hierdurch spezifisch sensibilisierten T-Lympho-

zyten.gelangen zunächst in die regionalen Lymphknoten und von hier aus ins gesamte lymphatische System, u.a. in die Milz (54). In diesen Geweben erfolgt dann die clonale Expansion und Differenzierung über T-Immunoblasten zu T-Immunozyten, von denen ein Teil als zytotoxisch wirksame Effektorzellen bzw. Killerzellen mit dem spezifischen Antigen des Transplantates reagieren und somit zur Zell-Lyse führen (15,54, 60). Neben diesem durch direkten Kontakt mit der Zielzelle ausgelösten Effekt scheinen diese Zellen jedoch auch lösliche Faktoren, sogenannte Lymphokinine freizusetzten (15,49). Große Bedeutung kommt dem chemotaktischen Faktor zu, der Makrophagen ins Transplantat zieht. Weitere Faktoren, wie der Makrophagen-Inhibitionsfaktor (MIF), der die Abwanderung der Makrophagen aus dem Entzündungsgebiet verhindert, und Faktoren, die Makrophagen aktivieren, spielen ebenfalls eine Rolle. Nicht zuletzt diesen und anderen freigesetzten Faktoren wird eine Bedeutung bei der Mitaktivierung immunkompetenter B-Zellen zugeschrieben (46,49). Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch der als T-Helferzellen fungierende Anteil der sensibilisierten T-Lymphozyten (46).

Letztendlich ist jedoch die vorhandene Stimulation der B-Zellen durch spezifisch sensibilisierte T-Zellen noch nicht vollständig geklärt. Die vorwie-

gend in den Lymphozyten lokalisierten und von dort ins Blut übergetretenen B-Zellen werden transformiert und proliferieren nach dem Kontakt mit den fremden Antigenen in den lymphatischen Geweben zu Plasmazellen, welche dann frei zirkulierende Antikörper der Klasse IgG und IgM produzieren.(15,54). Diese ganz spezifisch gegen bestimmte Oberflächenstrukturen des Fremdkörpers gerichtete Immunglobuline besetzen diese und machen sie somit phagozytierbar für Makrophagen und neutrophile Granulozyten (sogenannte Opsonierung). Insbesondere dem IgG schreibt man eine Funktion bei der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität im Rahmen des ADCC-Systems zu (60), wobei die Zell-Lyse dann durch gebundene K-Zellen erfolgt, die vermutlich wiederum dem T-Zell-System angehören, durchaus aber auch B-Zellen, Makrophagen oder neutrophile Granulozyten sein können. Weitere Klärung steht hier noch aus.

Die von beiden Zellsystemen bewirkte Zell-Lyse macht für diesen Vorgang nicht unbedingt zusätzliche Serumfaktoren oder Komplementanteile erforderlich, jedoch hängt die Stärke der Abstoßungsreaktion von der Möglichkeit einer entsprechenden Komplementaktivierung ab und ihre Mitwirkung ist heute unbestritten (15). Der Komplementfaktor C_3 begünstigt mittels Opsonierung die Phagozytose durch Makrophagen und

neutrophile Granulozyten. Aktive Fragmente der Faktoren C_3 und C_5 weisen vasoaktive Eigenschaften auf, fördern die Freisetzung von Histaminen aus Leukozyten und Mastzellen und wirken chemotaktisch, was die Infiltration des Transplantates mit mononuklearen und polymorphkernigen Blutzellen fördert. Neben einer erhöhten Gewebspermeabilität wird auch das Kininsystem aktiviert und damit auch das Gerinnungssystem über den Hagemann-Faktor. Thrombozyten beteiligen sich an der Mikrothrombenbildung durch direkte Wechselwirkung ihrer Oberflächen mit den Immunglobulinen. Lokal wird durch diese vielgegliederten Maßnahmen eine Vernichtung des Transplantats erreicht.(15).

Von dem in den vorliegenden Versuchen verwendeten Kalbsmilzextrakt ist aus früheren Untersuchungen bekannt, daß er in vitro den Thymidineinbau in B- und T-lymphoiden Zellen reversibel, gewebespezifisch und artunspezifisch (23) sowie in vivo die Zellproliferation einer transplantierten T-Zelleukämie im Thymus von Mäusen hemmt (24),somit der Definition nach einem Lymphozytenchalon entspricht. Eine Hemmung der Milzfollikelaktivierung, wie beschrieben, konnte demnach erwartet werden. Das Ausmaß der Hemmung betrug knapp 50 Prozent. Unbeeinflußt blieb jedoch die Aktivierung der übrigen Follikel und somit die hierdurch am Transplantat bewirkten und zum Teil sich selbst verstärken-

den Abwehrvorgänge (51). Auf die bedeutende Rolle unspezifischer Abwehrvorgänge, wie oben beschrieben, soll noch einmal ausdrücklich hingewiesen werden. Dafür spricht die Tatsache, daß T-Lymphozyten nicht die überragende Zellart am Ort der Reaktion sind und Monozyten einen wesentlichen Bestandteil ausmachen (46).

Wegen der nur zu 50 Prozent zu unterdrückenden Immunreaktion, die zu unbeeinträchtigter Transplantatabstoßung führte, muß die Anwendung höherer Milzextraktdosen diskutiert werden. Die Dosis von 1 mg des teilweise gereinigten Milzextraktes Ü30 jeden 2.Tag wurde gewählt, da sie sich in einer anderen Versuchsanordnung in vivo als optimal erwiesen hatte (25).

Es ist denkbar, daß Leukämiezellen, die in diesem Versuch durch den Milzextrakt gehemmt wurden, sensibler sind als gesunde, im Rahmen einer Immunreaktion proliferierende Lymphozyten (3).

Außerdem ist zu diskutieren, daß physiologische,nicht toxische Regulatoren selten maximale Hemmungen zeigen. Ihre Aufgabe liegt in der Erhaltung eines Proliferationsgleichgewichtes, das sie zusammen mit weiteren Faktoren - Synergisten und Antagonisten-gewährleisten (27). Es ist weiterhin denkbar, daß der hier verwendete Milzextrakt alleine die Transplantatabstoßung auch in höherer Konzentration nicht verhindern kann. Es

konnte jedoch gezeigt werden, daß er die Milzfollikelaktivierung zu annähernd 50 Prozent unterdrücken und somit als ein in vivo wirksamer Regulator gelten kann.

Ferner ist zu berücksichtigen, daß der Inhibitor der Kalbsmilz nicht in völlig gereinigter Form angewendet werden konnte. Wegen der großen Verluste bei der Reinstpräparation müßte man, um für Tierversuche genügend Reinsubstanz zu haben, Großraumpräparationen durchführen, die in einem wissenschaftlichen Labor nicht möglich sind. Nicht auszuschließen ist somit, daß im halbreinen Extrakt neben Inhibitoren noch Stimulatoren vorhanden waren, die eine komplette Immunsuppression verhinderten.
Großtechnische Präparation des Milzfaktors ist somit die Voraussetzung für weitere Untersuchungen.

4.2.

Bei Injektion artfremder Substanzen ist die Frage einer eventuellen Antigenität zu klären. Der Beantwortung dieser Frage diente die Durchführung des Immundiffusionstestes nach Ouchterlony.
Gemäß der in 2.10 I-III beschriebenen Durchführung wurde versucht, durch Zufügen von Mäuseseren in steigender Konzentration bei möglichst kurzer Diffusionsstrecke und -zeit nach dem Prinzip der Doppeldiffusion eine Antigen - Antikörperreaktion mit dem

teilweise gereinigten Milzextrakt Ü30 herbeizuführen.

Eine Bildung großer, netzwerkartiger und damit sichtbarer Immunkomplexe ist dann zu erwarten, wenn Antigen und präzipitierender Antikörper in einem mehr oder weniger ausgewogenen Verhältnis vorliegen, somit Äquivalenz besteht.(34).

Aufgrund der fehlenden Präzipitationslinien kann vorsichtig gefolgert werden, daß die vier Wochen dauernde intravenöse Applikation des teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes Ü30 in den Mäusen nicht zur Bildumg präzipitierender Antikörper geführt hat.

Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß die für die Ausbildung von sichtbaren Präzipitationsbanden geforderte, obig beschriebene Äquivalenz von Antigen und Antikörper trotz Konzentrierung der Mäuseseren eventuell nicht erreicht wurde. Nicht vorhandene Banden schließen somit das Fehlen von Antikörpern in den untersuchten Seren nicht mit letzter Sicherheit aus.

Die Annahme geringer Antigenität steht im Einklang mit Angaben von THORNLEY (63) und RYTÖMAA (59). Geringe Antigenität ist im Hinblick auf einen eventuell künftigen therapeutischen Einsatz von Lymphozytenchalon als Immunsuppressivum oder als Regulator der Zellproliferation von Bedeutung.

4.3.

Die Regulation der Zellproliferation von Normal- und Tumorgeweben erfolgt in sehr komplexer Weise durch eine Reihe fördernder und hemmender Faktoren. Zu den letztgenannten werden gewebespezifische, nicht toxische, artunspezifische Proliferationsinhibitoren (Chalone) (33,40) gezählt.

Nach weitgehend großtechnischer Reindarstellung ist ein therapeutischer Einsatz der Chalone als zyklusphasenspezifische Proliferationsinhibitoren mit Gewebepräferenz in der Behandlung maligner Tumoren, eventuell in der Kombination mit bereits bekannten antineoplastischen Medikamenten unter Schonung proliferierender Gewebe denkbar (40).
Eine Heilung durch alleinige Chalontherapie ist zweifelhaft (23). Dagegen ist ein Einsatz als Immunsuppressivum mit geringerer Nebenwirkungsrate vorstellbar.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Anhand vergleichender Beurteilung der Abstoßungsreaktion allogen transplantierter Hautstücke sowie der unterschiedlichen Milzfollikelaktivierung bei Mäusen sollte die Wirkung eines aus Kalbsmilzen erhaltenen, teilweise gereinigten Extraktes auf beide Parameter gezeigt werden. Zusätzlich wurde ein Immundiffusionstest zur Ermittlung der Antigenität des Extraktes durchgeführt.

Am Tag der Operation beginnend, wurde den Tieren mit homologen Hauttransplantaten vier Wochen lang jeden 2.Tag 1mg eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes Ü30 i.v. verabreicht. Dieser hemmt die Lymphozytenproliferation nicht toxisch, reversibel, gewebespezifisch und artunspezifisch (23). Die Tiere der anderen Gruppe erhielten gleichzeitig das gleiche Volumen physiologischer Kochsalzlösung.

Als Kontrollgruppen dienten Mäuse mit syngenen Hauttransplantaten, des weiteren nur mit Ü30-Lösung sowie gänzlich unbehandelte Tiere.

Bezüglich der Abstoßungsreaktion zeigten sich zwischen den mit NaCl und mit Ü30 behandelten Tieren keine Unterschiede (51), jedoch war die durch homologe Transplantation ausgelöste Follikelaktivierung der Milz in der zuletzt genannten Gruppe signifikant vermindert. Somit konnte eine hemmende Wirkung paren-

teral verabreichten Ü30 auf ein durch homologe Hauttransplantation aktiviertes Immunsystem dokumentiert werden. Das Ausmaß war jedoch nicht ausreichend, um eine Verzögerung der Abstoßung zu bewirken..Eine antigene Potenz, die zur Bildung von Antikörpern bzw. Präzipitationsbanden im Immundiffusionstest geführt hätte, ließ sich nicht nachweisen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

(1) ALLEN,J.C.,SMITH,C.J.,CURRY,M.C.,GAUGAS,J.M.: Identification of a thymic inhibitor ("chalone") of lymphocyte transformation as a spermine complex. Nature 267 623-625 (1977)

(2) ALLEN,J.C.,SMITH,C.J.: Chalones: A rappraisal Biochemical Reviews 7, 584-592 (1979)

(3) ANDERSON,S.,ANQUIER,A.,HAUCK,W.W.,CAKES,D., VANDAELA,W.,WEISBERG,H.J.: Statistical methods for comparative studies. John Wiley and sons, 164-167, New York 1980, 1.Aufl.

(4) BALAZS,A.,GAL,F.,BLASEK,J.: In vitro sensivity of transportable leukemias to endogenous granuloid (CCE,GI-2) and lymphoid (T4, T4-1), inhibitors of proliferation. Oncology 37, 8-14 (1978).

(5) BILLINGHAM,R.E.,SILVER,F.R.S.,W.K.W.K.: Studies on homograft of foetal and infant skin and further observations on the anomalous properties of pouch skin graft in hamsters. Research career Dev.,U.S. Public Health Service 168-189, (1964).

(6) BULLOUGH,W.S.,LAURENCE,E.B.: The control of epidermal mitotic activity in the mouse. Proc. Roy. Soc. B., 151, 517-536 (1960)

(7) BULLOUGH,W.S.: The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. Biol. Rev. 37, 307-342 (1962).

(8) BULLOUGH,W.S.,LAURENCE,E.B.: Mitotic control by internal secretion: the role of the chalone-adrenalin complex.
Exp. Cell. Res. 33, 176-194 (1964)

(9) BULLOUGH,W.S.: The evolution of differentiation
London, New York: Academic Press 112-117 (1967)

(10) CHUNG,A.C.,HUFNAGEL,C.A.: Some in vivo effects of chalone (mitotic inhibitor) obtained from lymphoid tissues.
Natl. Cancer Inst. Monogr. 38, 131-134 (1973)

(11) CLEAVER,J.E.: Thymidin Metabolism and Cell Kinetics
Amsterdam, North Holland Publ.Comp. 93-97 (1967)

(12) COOPERBRAND,S.R.,BADGER,A.M.,DAVIS,R.,SCHMID,K., MANNICK,J.A.: The effect of immunregulatory Globulin (IRA) upon lymphocyte in vitro
The Journal of Immunology, 109, 154-163 (1972)

(13) DIEM,K.,LENTNER,C.: Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen
Geigy Pharmazeutika, Wehr (Baden), 167, 1968 7.Aufl.

(14) ERNSTRÖM,U.,NORDLIND,K.: Characterization of a splenic factor inhibiting DNA-Synthesis in lymphocytes in vitro.
Acta path. microbiol. scand. sect. A, 85, 105-112 (1977)

(15) FILIPP,G.: Allergologie I., 444-449 1.Aufl. Verlag Dr. Edmund Banaschewski, München 1980

(16) FUDENBERG,H.J.,STIKES,D.P.,CALDWELL,J.L.,WELLS, J.V.: Basic and Clinical Immunology. 281-186, 1st.ed. Los Altos, Lange Medical Publications 1976

(17) GANSER,H.: Wirkung eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes (Lymphozytenchalon) auf die Zellproliferation in Lymphknoten, in Dünndarmepithelien und in Epidermiszellen, sowie auf das Blutbild von AKR-Mäusen.
Diss. im Fachber. Klin. Med. der Uni Tüb. (1980)

(18) GARCIA-GIRALT,E.,LASALVIA,E.,FLORENTIN,I.,MATHE, G.: Evidence for a lymphocytic chalone. Rev. Europ. Etudes Clin et Biol. XV, 1012-1015 (1970)

(19) GARCIA-GIRALT,E.,MORALES,V.H.,BIZZINI,B.,LASALVIA,E.: Prevention of graft versus host reaction by incubation of lymphoid cells with a splenic extract (not affecting the repopulation of the haemopoietic tissue).
Cell Tissue Kinet. 6, 567-571 (1973)

(20) GARILHE,M.P.de,VEDEL,M.,TEMPETE,Ch.,F,GARCIA-GIRALT,E.: Endogenous factors possessing lymphoid chalone properties purified by chromatography.
Biomedicine, 31, 148-154 (1980)

(21) GRUNDBOECK-JUSKO.J.: Purification of chalone from the spleen of cattle.
Bull. Vet. Inst. Pulaxy 19, 41-48, 1975

(22) GUILLON,P.J.,BUSCH,J.,GILES,G.R.: Prolongation of murine skin allografts across a major histocompatibility locus using supernatants from Con-A activated spleen cells.
Biomedicine, 31 196-198, (1979)

(23) HEIDEMANN,E.,JUNG,A.,WILMS,K.: Gewebespezifische Hemmung der Lymphozytenproliferation durch Milzextrakt (Lymphozytenchalon).
Klin. Wschr. 54, 221-226 (1976)

(24) HEIDEMANN,E.,GANSER,H.,PODGORNIK,N.,RUTSCH,H., WILMS,K.,WÖRZ,F.: Proliferationshemmung der AKR-Mäuseleukämie in vivo mit Kalbsmilzextrakt (Lymphozytenchalon).
Blut 34, 381-383 (1977)

(25) HEIDEMANN,E.,GANSER,H.,PODGORNIK,N.,RUTSCH,H., WILMS,K.,WÖRZ,F.: Gewebespezifische Proliferationshemmung lymphoider Zellen in vitro und in vivo mit Kalbsmilzextrakt (Lymphozytenchalon)
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 1115-1119 (1977)

(26) HEIDEMANN,E.,PODGORNIK,N.,WILMS,K.: Tissue-specific Inhibitor of Lymphocyte Proliferation Extracted and Purified from Calf Spleen.
Blut 39, 271-279 (1979)

(27) HEIDEMANN,E.: Humorale Regulatoren der Zellproliferation in der Hämatopoese.
Klin. Wschr. 58, 1117-1133 (1980)

(28) HOOPER,J.A.,Mc DANIEL,M.C.,THURMAN,G.B.,COHEN, G.H.,SCHULHOF,R.S.,GOLDSTEIN,A.L.: Purification and properties of bovine thymosin
Annals N.Y. Acad. Sc. 249, 125-144 (1977)

(29) HOUCK,J.C.,IRAUSQUIN,H.,LEIKIN,S.: The Lymphocyte DNA Synthesis Inhibition
Science 173, 1139-1141 (1971)

(30) HOUCK,J.C.,IRAUSQUIN,H.,LEIKIN,S.: The lymphocyte chalone
Clinical Proceedings of Children's Hospital of the District of Columbia 28, 130-137 (1972)

(31) HOUCK,J.C.,ATTALLAH,A,M.,LILLY,J.R.: Immunosuppressive properties of the lymphocyte chalone .
Nature 245, 148-150 (1973)

(32) HOUCK,J.C.,ATTALLAH,A.M.: Chalones
Amsterdam, Oxford, New York: North Holland Publ. Co. 1st ed. (1976)

(33) IVERSEN,O.H.: The chalones
In Handbook of Experimental Pharmacology, Baserga,R. (Hrsg) 491-550,
Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1981

(34) KELLER,R.: Immunologie und Immunpathologie
77-81, 1.Aufl., Stuttgart Thieme Verlag (1977)

(35) KIGER,N.: Isolation and immunological study of thymic lymphocytic inhibitory factor Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. XVI, 556-572 (1971)

(36) KIGER,N.,FLORENTIN,I.,MATHE,G.: Some effects of a partially purified lymphocyte-inhibiting factor from calf-thymus. Transplantation 14, 448-453 (1972)

(37) KIGER,N.,FLORENTIN,I.,GARCIA-GIRALT,E.,MATHE,G.: Lymphocyte inhibitory factors (chalones) extracted from lymphoid organs. Extraction, partial purification and immunosuppressive properties. Transplantation Proceedings Vol VI, No.4, 531-535 (1972)

(38) KIGER,N.,FLORENTIN,I.,MATHE,G.: A lymphocyte-inhibiting factor (chalone?) extracted from thymus: immunosuppressive effects. National Cancer Institute Monograph 38, 135-142 (1973)

(39) KIGER,N.,FLORENTIN,I.,MATHE,G.: Further purification and chemical characterization of the lymphocyte inhibiting factor extracted from the thymus (LIFT). Immunology 33, 439-448 (1977)

(40) LANGEN,P.: Zellkinetik in klin. Tumortherapie Tanneberger,S. (Hrsg), Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York: 193-217 Bd.I, 1.Aufl. (1980)

(41) LASALVIA,E.,GARCIA-GIRALT,E.,MACIEIRI-COELHO,A.: Extraction of an inhibitor of DNA synthesis from human peripheral blood lympho-

cytes and bovine spleen.
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. XV, 788-792 (1970)

(42) LAURENCE,E.B.: The significance of chalones in epidermal growth.
In: The skin of vertebrates. Spearman, R.I.,Riley,P.A.(eds), 139-150, Linnean Soc.Symp.Ser. 9 London (1980)

(43) LEHMANN,W.,SAMTLEBEN,R.,GRAETZ,H.,SCHÜTT,M.,LANGen,P.: On a chalone-like factor for the Ehrlich-ascites mammary carcinomas
Acta Biolog. Med. Ger. 39, 93-105 (1980)

(44) LENFANT,M.,DI GIUSTO,L.,GARCIA-GIRALT,E.: Is lymphocytic chalone activity restricted to a protein spermine complex?
Nature 277, 154 (1979)

(45) LILLY,J.R.,HOUCK,J.C.: In vivo immunosuppression with lymphocyte chalone
Surgical Forum 24, 339-340 (1973)

(46) MACKANESS,G.: Delayed hypersensivity
In: Immunological Diseases VolI,3rd ed, Samter,M.(Hrsg) Little Brown and Comp. pp. 281-293 (1978)

(47) MASCHLER,R.,MAURER,H.R.: A lymphocyte chalone assay using lymphocyte growth in agar capillaries
Virchows Arch.B Cell Path.25,345-353 (1977)

(48) MATHE,G.KIGER,N.FLORENTIN,I.GARCIA-GIRALT,E.MARTYRE,M.HALLE-PANNENKO,O.SCHWARTZENBERG,L.: Progress in the prevention of GVH: Bone marrow grafts after ALG conditioning,with

lymphocyte split chimerism, use of a lymphocyte"chalone-T" and soluble histocompatibility antigens.
Transplant. Proc. 5, 933-939 (1973)

(49) METCALF,D.,MOORE,M.A.S.: Humoral factors in immune response.
In: Haemopoietic Cells, Neuberger,A., Tatum,E.L. (Hrsg) pp. 364-380, 422-447 (1971)

(50) MOORHEAD,I.F.,PARASKOVA-TSCHERNOZENSKA,E., PIRRIE,A.I.,HAYES,C.: Lymphoid inhibitor of human lymphoid DNA synthesis and mitosis in vitro.
Nature 224, 1207-1208 (1969)

(51) MORE,G.: Einfluß eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes (Lymphozytenchalon) auf die Transplantatabstoßung bei Mäusen.
Diss. im Fachber. Klin. Med. der Univ. Tüb. (1980)

(52) OLLSON,L.,CLAESSON,M.H.: Studies on the regulation of lymphocyte production in the murine thymus and some effects of a crude thymus extract.
Cell Tissue Kinet. 8, 491-502 (1975)

(53) PERRINS,D.J.D.,WIENIK,G.,JONES,W.A.: Granulocyte chalone assayed in vivo in the mouse
Acta Haemat. 64, 72-78 (1980)

(54) ROTTER,W.: Immunpathologie und Entzündungen
In: Lehrbuch der Pathologie Bd.II, 1.Aufl. pp 23-27, F.K.Schattauer Verlag Stuttgart, New York (1975)

(55) RYTÖMAA,T.,KIVINIEMI,K.: (a) Control of granulocyte production. I.Chalone and antichalone, two specific humoral regulators. Cell Tissue Kinet.1, 329-340 (1968)

(56) RYTÖMAA,T.,KIVINIEMI,K.: (b) Control of granulocyte production. II.Mode of action of chalone and antichalone. Cell Tissue Kinet.1, 341-350 (1968)

(57) RYTÖMAA,T.,KIVINIEMI,K.: Chloroma induced by granulocyte chalone. Nature 222, 995-996 (1969)

(58) RYTÖMAA,T.,VILPO,J.A.,LEVANTO,A.,JONES,W.A.: Effect of granulocyte chalone on acute and chronic granulocytic leukaemia in man Report of seven cases. Scand. Journal of Haematology 27,5-28 (1976)

(59) RYTÖMAA,T.,VILPO,J.A.,LEVANTO,A.,JONES,W.A.: Effect of granulocytic chalone on acute myeloid leukaemia in man.(A follow up study) The Lancet 9, 771-774 (1977)

(60) DAAL,J.G.: Lymphotoxizität: Modell einer zellulären Tumorabwehr In: Die gelben Hefte 21, 138-148, Bösel B.,Hennessen,W.(Hrsg) Medizin.Verlagsges. GmbH, Marburg (1981)

(61) SIEGENTHALER,W.: Klin. Pathophysiologie 482-500 3.Aufl.Thieme Verlag Stgtt. (1976)

(62) THORBECKE,G.,LERMAN,S.P.: Germinal centres and their role in immune response

Advances Exp. Med. Biol. 73A, 83-100 (1976)

(63) THORNLEY,A.L.,LAURENCE,E.B.: The present state of biochemical research on chalones. Int. J. Biochem. 6, 313-320 (1975)

(64) WEISS,P.,KAVANAU,J.L.: A model of growth and growth control in mathematical terms. J. Gen. Physiology 41, 1-47 (1957)

(65) WIEMANN,K.: Infektion, Immunität, Identität 125-131 1.Aufl. Med. Verlagsges. GmbH Marburg (1977)

(66) WÖRZ,F.: Wirkung eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes (Lymphozytenchalon) auf lymphatische Zellen in vivo. Dissert. im Fachber. Klin. Med. der Univ. Tübingen (in Vorbereitung).

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H.D.Waller
für die Überlassung des Themas.
Ganz besonderen Dank möchte ich Frau Priv. Doz.
Dr. E.Heidemann für den Rat und die Unterstützung
aussprechen, die sie mir in allen Phasen während
der Erstellung dieser Arbeit zukommen ließ.
Vielen Dank auch den Mitarbeitern der Medizinischen
Klinik und des Pathologischen Institutes der Univer-
sität, die in irgendeiner Weise an der Fertigstel-
lung der Arbeit teilhatten.

Lebenslauf

Am 25.9.1954 wurde ich, Armin Schneider, als Sohn des August Schneider und seiner Ehefrau Maria, geb. Pfauth in Ravensburg geboren.

In den Jahren 1960 bis 1964 besuchte ich die Katholische Volksschule in Obereschach, um anschließend an das Albert-Einstein-Gymnasium in Ravensburg zu wechseln, das ich 1973 mit bestandenem Abitur verließ. Von Oktober 1973 bis April 1974 absolvierte ich am Psychiatrischen Landeskrankenhaus Weissenau ein Krankenpflegepraktikum und begann zum Sommersemester 1974 das Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.

Im Sommer 1978 war mir während eines USA-Aufenthaltes eine mehrwöchige Famulatur am California Hospital Medical Center in Los Angeles möglich.

Nach dem praktischen Jahr am Städtischen Krankenhaus Friedrichshafen legte ich am 16. Oktober 1980 den Dritten Teil der Ärztlichen Prüfung ab und begann am 1.1.1981 meine ärztliche Tätigkeit an der Fachklinik für Kinder und Jugendliche in Wangen.

Seit August 1982 bin ich als Assistenzarzt am Institut für Anästhesie des Städtischen Krankenhauses in Friedrichshafen tätig.